

بررسی تأثیر لیپولی ساکارید باکتریایی بر ساختار و دینامیک پلیمریزاسیون توبولین های موشی

فاطمه هاشمی شهرکی^۱، محمد علی نصیری خلیلی^{۲*}، سیروس خدادادی^۲، غلامحسین ریاضی^۳

^۱دانشجو، گروه بیوشیمی و بیوفیزیک، دانشگاه صنعتی مالک اشتر تهران، تهران، ایران؛ ^۲گروه بیوشیمی و بیوفیزیک، دانشگاه صنعتی مالک اشتر

تهران، تهران، ایران؛ ^۳مرکز تحقیقات بیوشیمی و بیوفیزیک، دانشگاه تهران، تهران، ایران.

تاریخ پذیرش: ۹۵/۲/۱۴

تاریخ دریافت: ۹۴/۱۲/۸

چکیده:

زمینه و هدف: در دهه های اخیر مطالعات بسیاری بر روی دینامیک پلیمریزاسیون دایمرهای توبولینی و نیز فاکتورهای موثر بر آن انجام شده است. بر اساس مطالعات صورت گرفته، لیپولی ساکارید (LPS) به صورت غیرمستقیم و از طریق مسیرهای آنزیمی، با هائیرفسفریلاسیون پروتین تاو، انفصال آن از میکروتوبول و در نهایت ناپایداری شبکه های میکروتوبولی، در القاء بیماری های تحلیل برنده سیستم عصبی به خصوص آلزایمر نقش دارد. هدف از این مطالعه، بررسی تأثیر مستقیم LPS در شرایط *in vitro* بر ساختار و دینامیک پلیمریزاسیون توبولین ها می باشد.

روش بررسی: در این مطالعه، توبولین های موشی طی دو سیکل پلیمریزاسیون/ دپلیمریزاسیون و به دنبال آن عبور از ستون کروماتوگرافی سلولز فسفات تخلیص شد. خلوص نمونه به دست آمده با استفاده از روش SDS-PAGE مورد ارزیابی قرار گرفت. تغییر در ساختارهای دوم و سوم، و نیز دینامیک پلیمریزاسیون توبولین در حضور غلظت های مختلف LPS (۵ پیکومولار، ۵ نانومولار، ۵۰ نانومولار، ۰/۵ میکرومولار و ۵ میکرومولار) به ترتیب با بهره گیری از تکنیک دورنگ نمایی دورانی (CD)، سنجش نشر فلورسانس ذاتی و کدورت سنجی مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته ها: نتایج حاصل از SDS-PAGE خلوص دایمرهای توبولینی را تأیید نمود. مطالعات دورنگ نمایی دورانی و نشر فلورسانس ذاتی، به ترتیب تغییر در ساختارهای دوم و سوم توبولین را در حضور LPS نشان دادند. نتایج حاصل از مطالعه کدورت سنجی نیز تأثیر LPS در کاهش پلیمریزاسیون دایمرهای توبولینی را نشان داد.

نتیجه گیری: بر اساس مطالعه صورت گرفته LPS قادر است طی میان کنش با دایمرهای توبولینی و تغییر در ساختارهای دوم و سوم، تمایل آن ها را برای برهمکنش با یکدیگر و پلیمریزاسیون کاهش می دهد. بر اساس نتایج به دست آمده، به نظر می رسد LPS علاوه بر اثرات غیرمستقیم خود در ناپایداری شبکه های میکروتوبولی، بتواند طی میان کنش مستقیم با دایمرهای توبولینی و اختلال در دینامیک پلیمریزاسیون آن ها نیز در القاء بیماری های تحلیل برنده سیستم عصبی به خصوص آلزایمر نقش ایفا کند.

واژه های کلیدی: توبولین های موشی، لیپولی ساکارید، پلیمریزاسیون، میکروتوبول، بیماری آلزایمر.

مقدمه:

لیپولی ساکارید (LPS)، ترکیب اندوتوکسینی دیواره ی سلولی باکتری های گرم منفی، علاوه بر داشتن خاصیت میتوژنی، با فعال کردن سلول های B منجر به رهایی سایتوکین های التهابی مانند اینترلوکین ۱ و ۲، فاکتور نکروز دهنده تومور و متابولیت هایی مانند نیتریک اکساید، رادیکال های آزاد اکسیژن و ایکوزانوئیدها می شود (۱). بررسی های متعدد نشان داده اند که LPS در القای بیماری های تحلیل برنده سیستم عصبی

*نویسنده مسئول: تهران- دانشگاه صنعتی مالک اشتر تهران- گروه بیوشیمی و بیوفیزیک- تلفن: ۰۲۱-۲۲۹۷۰۰۸۵

E-mail: manasiri@alumni.ut.ac.ir

از جمله پارکینسون، هانتینگتون، آمیوتروفیک لترال اسکلروزیس و به خصوص آلزایمر نقش دارد. تزریق لیپولی ساکارید به ناحیه مرکزی یا پیرامونی مغز موش، منجر به فعال شدن سلول های میکروگلیا، التهاب مغزی و به دنبال آن از بین رفتن نورون های منطقه جسم سیاه مغز و مرگ نورون های دوپامینرژیک می شود (۲). لیپولی ساکارید همچنین قادر است با تحریک اعصاب آوران و تغییر در نفوذپذیری سد خونی-مغزی وارد مغز شود (۳). گلیکوپروتئین CD14 و TLR4 گیرنده های اصلی اتصال به LPS هستند. علاوه بر این TLR2، hsp90، مولکول های چسبنده سلولی، خانواده ی بتا اینتگرین، کانال های کلسیمی و کانال های وابسته به ولتاژ پتاسیمی از دیگر پروتئین هایی هستند که می توانند به LPS متصل شده و در پاسخ به آن ایفای نقش کنند. رسپتورهای Nod1 و Nod2 نیز پروتئین های درون سلولی متصل شونده به لیپولی ساکارید می باشند که توسط سیستم ایمنی ذاتی شناسایی و منجر به عفونت های درون سلولی می شوند (۳،۴).

نورون ها به منظور حفظ عملکرد خود به طور موثری نیازمند به انتقال اندامک های درون سلولی مانند میتوکندری، شبکه اندوپلاسمی، لیزوزیم، پروتئین ها و لیپیدها از جسم سلولی به سمت آکسون و دندریت می باشند. این انتقال کاملاً وابسته به پلیمرهای توبولین است. از این رو حضور میکروتوبول های پویا برای عملکرد شبکه های نورونی ضروری به نظر می رسد (۵،۶). در سال های اخیر تحقیقات بسیاری جهت تشخیص مکانیسم حافظه انجام گرفته شده است. مطالعات متعددی به منظور توضیح مکانیسم حافظه و رفتارهای هوشمندانه موجودات زنده، شبکه های میکروتوبول را به دلیل ماهیت دینامیکی آن ها مورد بررسی قرار داده اند (۷،۸). میکروتوبول ها لوله های استوانه ای شکل توخالی، متشکل از دایمرهای الفا و بتا توبولین هستند. دایمرهای توبولین از طریق میان کنش با تعدادی از پروتئین ها و مولکول های کوچک از جمله نوروپپتیدها، نوکلئوتیدها و داروهای که دینامیک عملکرد آن ها را کنترل می کنند، در

فرآیند شکل گیری حافظه مشارکت می کنند. این شبکه پروتئینی در سایر اعمال حیاتی سلول از جمله شکل دهی به ساختمان اسکلت سلولی، انتقالات آکسونی، تشکیل دوک تقسیم، تقسیم کروموزومی و نیز انتقال پیام های درون سلولی نقش دارد (۹،۱۰). ارتباط درونی پروتئین تاو با توبولین ها در نورون، برای حفظ چارچوب و ساختمان نورون ها ضروری می باشد. میکروتوبول ها در آکسون ها به صورت دستجات منظم یافته و موازی، به سمت سیناپس نورون آرایش یافته اند (۱۱). این آرایش ساختاری در انتقالات نوروترنسمیترها، انتقال سیگنال و عملکرد شناختی نورون ها نقش مهمی ایفا می کند. در بیماری های تحلیل برنده سیستم عصبی به خصوص آلزایمر نقص در عملکرد میکروتوبول های آکسونی دیده شده است.

پروتئین تاو، یک پروتئین همراه میکروتوبولی است که نقش مهمی در پایداری و پلیمریزاسیون میکروتوبول ها دارد. در بیماری های تائوپاتی، هایپرفسفریلاسیون این پروتئین منجر به انفصال آن از سطوح میکروتوبول و متعاقباً ایجاد نقص در سیستم انتقالات آکسونی می شود. بر اساس این یافته ها، تحت التهاب ناشی از LPS، هایپرفسفریلاسیون پروتئین تاو توسط مسیرهای فعال سازی آنزیم های کینازی صورت می گیرد (۱۴-۱۲). از این طریق میان کنش آن را با دایمرهای توبولین تحت تأثیر قرار می دهد و در نهایت موجب انفصال آن از توبولین و ناپایدار شدن میکروتوبول ها می شود (۱۸-۱۵).

با وجود اثبات تأثیر LPS بر سمیت سلولی، انتقال سیگنال از طریق رسپتورهای اختصاصی تحریک هایپرفسفریلاسیون تاو و همچنین اثبات نقش دایمرهای توبولینی در حافظه و یادگیری، تاکنون گزارشی مبنی نقش LPS در القاء بیماری های تحلیل برنده سیستم عصبی با واسطه میان کنش مستقیم آن با پروتئین های توبولینی ارائه نشده است (۱،۲،۲۷-۱۹). از این رو در این مطالعه ما علاقه مند به بررسی میان کنش مستقیم LPS با پروتئین های توبولینی و بررسی اثرات آن بر

ساختار و عملکرد دایمرهای توبولینی در شرایط *in vitro* شدیم.

روش بررسی:

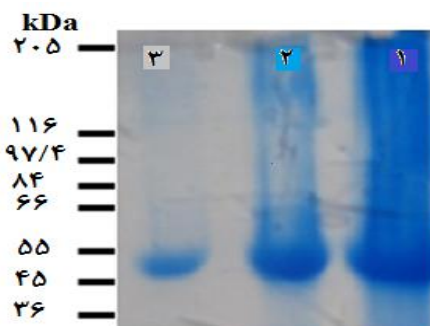
مواد مورد نیاز شامل گلیسرول، LPS، منیزیم گوانوزین تری فسفات (MgGTP)، بافر PIPES و سولفات منیزیم از شرکت سیگما و سایر مواد شامل اسید کلریدریک، اسید فسفریک، اتانول، کوماسی بلو G250، پروتئین آلبومین سرم گاوی و پتاس (KOH) از شرکت مرک (MERCK) تهیه گردید.

پس از کشته شدن موش ها، منتر و رگ های خونی از مغز در شرایط دمای 4°C جدا گردید. مغز موش ها پس از توزین، در حضور بافر هموژنیزه کننده (یک میلی مولار MgGTP) خرد شد. عمل هموژنیزاسیون به مدت ۵ ثانیه با سرعت بالا و ۴۵ ثانیه با سرعت پایین، انجام گرفت. به منظور جداسازی بافت های تخریب نشده از اجزای سیتوزولی، سانتریفیوژ هموژنات اولیه در دمای 4°C به مدت ۶۰ دقیقه در سرعتی معادل ۱۰۰۰۰۰ گرم انجام شد. سپس سوپرناتانت در دمای اتاق با نسبت یک به یک، توسط بافر PMG (حاوی ۱ میلی مول، $\text{MgSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ۰/۵ میلی مول و PIPES ۸۰ میلی مول و ۱۲۰ میلی لیتر گلیسرول) رقیق و برای شروع پلیمریزاسیون، MgGTP (غلظت نهایی ۰/۲ میلی مولار) به آن اضافه گردید و pH به ۶/۹۴ رسانده شد. پلیمریزاسیون به مدت ۴۵ دقیقه در حمام آب گرم انجام شد. در ادامه میکروتوبول ها به مدت ۴۵ دقیقه در دمای 25°C با سرعتی معادل ۱۰۰۰۰۰ گرم رسوب داده شدند و یک پنجم حجم هموژنات اولیه از بافر PEM (حاوی ۱ میلی مول، EGTA ۱ میلی مول، $\text{MgSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ۰/۵ میلی مول و PIPES ۸۰ میلی مول) با pH= ۶/۹۴ به همراه GTP (غلظت نهایی ۰/۲ میلی مولار) به رسوب اضافه و به وسیله ی هموژنایزر، سوسپانسیون یکنواختی حاصل شد. به مدت نیم ساعت هر ۵ دقیقه یک بار دپلیمریزاسیون

روی یخ انجام گرفت. سانتریفیوژ در دمای 4°C به مدت ۴۵ دقیقه با سرعتی معادل ۱۰۰۰۰۰ گرم جهت شفاف سازی محلول انجام شد. سیکل دوم پلیمریزاسیون با رقیق کردن سوپرناتانت مرحله قبلی با نسبت یک به یک با بافر PMG به همراه GTP (غلظت نهایی ۰/۲ میلی مولار)، در دمای 25°C انجام شد. میکروتوبول ها از دیگر پروتئین ها و نیز توبولین های فاقد فعالیت پلیمریزاسیون، توسط سانتریفیوژ با سرعت ۱۰۰۰۰۰ گرم تفکیک شدند. دپلیمریزاسیون رسوب ایجاد شده با هموژنایزر در سردخانه به مدت نیم ساعت و با مقدار کافی از بافر PEM به همراه GTP انجام شد. پس از انجام این مراحل، سوپرناتانت حاصل برای خالص سازی بیشتر از ستون کروماتوگرافی تعویض یونی فسفوسلولز عبور داده شد (۲۸). سپس خلوص پروتئین با استفاده از روش SDS-PAGE (شامل ژل متراکم کننده ۵٪ با $\text{pH}= 6/8$ و ژل جداکننده ۱۲٪ با $\text{pH}= 8/8$) مورد بررسی قرار گرفت. غلظت توبولین نیز به روش برادفورد مورد محاسبه قرار گرفت.

جهت بررسی فلورسانس ذاتی توبولین در حضور لیپولی ساکارید از روش فلورسانس ذاتی استفاده شد. میزان نشر فلورسانس توبولین (با غلظت ۵ میکرومولار)، در حضور غلظت های مختلف لیپولی ساکارید (۵ میکرومولار، ۰/۵ میکرومولار، ۵۰ نانومولار، ۵ نانومولار و ۵۰۰ پیکومولار) پس از ۵ دقیقه انکوباسیون در دمای اتاق، مورد ارزیابی قرار گرفت. در این مطالعه تریتوفان ها در طول موج ۲۷۵ نانومتر تهییج و میزان نشر آن ها از طول موج ۳۰۰ تا ۴۰۰ نانومتر مورد بررسی قرار گرفت.

به منظور مطالعه الگوی تغییرات ساختار دوم توبولین در حضور LPS، از دستگاه اسپکتروپلاریمتر مدل ۲۱۵ استفاده شد. برای اندازه گیری طیف CD در محدوده فرابنفش دور، از غلظت ۳ میکرومولار توبولین به همراه غلظت های ۵۰۰ پیکومولار و ۵ میکرومولار لیپولی ساکارید و سل با ضخامت ۰/۱ میلی متر استفاده شد.



به منظور ارزیابی فعالیت توبولین، تغییرات جذب آن در طول موج ۳۵۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر Cary (کدورت سنجی) در دمای ۳۷ °C و با فواصل زمانی ۵ ثانیه، به مدت ۳۰ دقیقه مورد ارزیابی قرار گرفت. در تمامی اندازه گیری ها از کووت کوارتز ۰/۹ میلی لیتری استفاده شد.

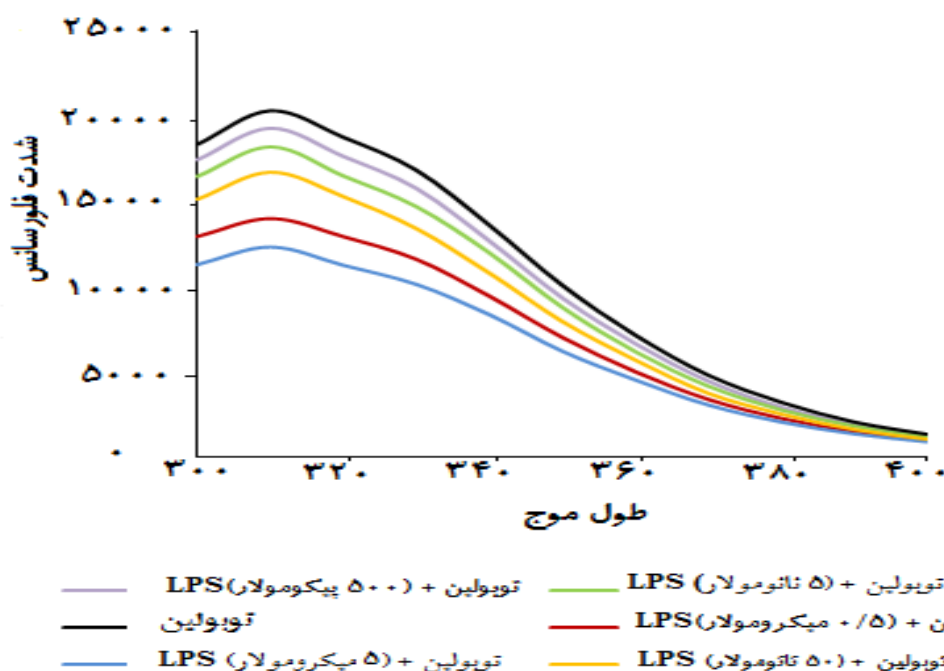
یافته‌ها:

نتایج SDS-PAGE نمونه های حاصل از مراحل مختلف تخلیص توبولین مغز موش نشان می دهد خلوص این پروتئین طی مراحل متوالی پلیمریزاسیون/دپلیمریزاسیون و نیز پس از عبور از ستون سلولز فسفات به تدریج افزایش یافته است (تصویر شماره ۱).

تصویر شماره ۱: بررسی تخلیص پروتئین توبولین با

استفاده از الکتروفورز SDS-PAGE

۱: پروتئین های سیکل اول استخراج ۲: پروتئین های سیکل دوم استخراج ۳: توبولین خالص شده پس از عبور از ستون سلولز فسفات؛ غلظت توبولین تخلیص شده (نمونه عبور یافته از ستون سلولز فسفات)، ۱/۴ میلی گرم در هر میلی لیتر برآورد شد.



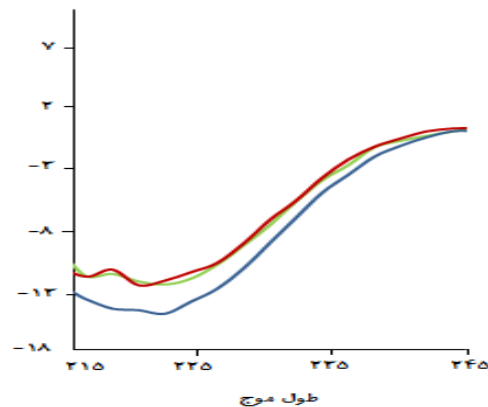
نمودار شماره ۱: طیف فلورسانس ذاتی توبولین در حضور و عدم حضور غلظت های مختلف لیپوپلی ساکارید

غلظت نهایی پروتئین توبولین ۵ میکرومولار می باشد.

آمده، میزان نشر فلورسانس توبولین در حضور LPS، در روندی وابسته به غلظت کاهش می یابد (نمودار شماره ۱).

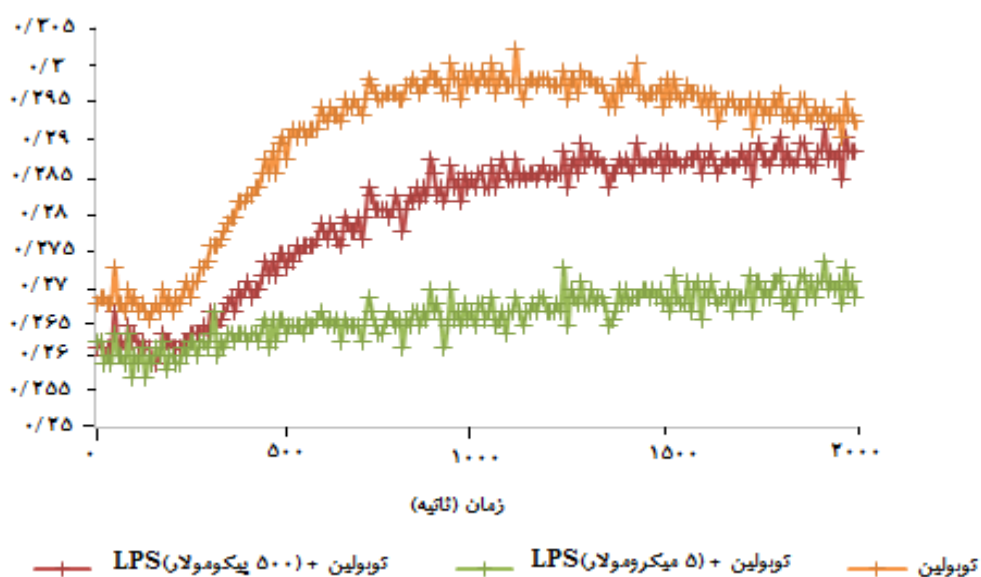
جهت بررسی تغییرات ساختمان سوم توبولین در حضور LPS، از روش طیف سنجی فلورسانس استفاده شد. بر اساس نتایج به دست

جهت مطالعه تغییرات ساختمان دوم توبولین در
حضور LPS، از تکنیک دورنگ نمایی دورانی در ناحیه
فرابنفش دور استفاده شد. نتایج به دست آمده نشان می دهند
انکوباسیون توبولین با LPS (غلظت های ۵ میکرومولار و
۵۰۰ پیکومولار)، منجر به کاهش محتوای ساختارهای دوم
در این پروتئین شده است (نمودار شماره ۲).



نمودار شماره ۲: طیف ناحیه دور توبولین (غلظت ۳ میکرومولار) در حضور و غیاب لیپوپلی ساکارید

به منظور بررسی اثر LPS بر روند پلیمریزاسیون
دایمرهای توبولینی، از روش کدورت سنجی استفاده شد.
بر اساس نتایج به دست آمده انکوباسیون دایمرهای
توبولینی در حضور لیپوپلی ساکارید، با کاهش تمایل آن ها
به یکدیگر منجر به افزایش زمان هسته زایی شده است.
نتایج به دست آمده همچنین نشان می دهند LPS علاوه بر
کاهش سرعت پلیمریزاسیون توبولین، موجب کاهش طول
پلیمرهای میکروتوبولی نیز شده است (نمودار شماره ۳).



نمودار شماره ۳: منحنی پلیمریزاسیون توبولین (۲۰ میکرومولار) در حضور غلظت ۵۰۰ پیکومولار و
۵ میکرومولار لیپوپلی ساکارید، در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و در حضور ۱ میلی مولار MgGTP

بحث:

آلزایمر، یک بیماری تحلیل برنده سیستم عصبی عمدتاً در ارتباط با مناطق هیپوکمپ و لیمبیک مغز بوده که به واسطه آن قدرت ادراک و شناخت به صورت تدریجی کاهش می یابد. یکی از فرضیه های اصلی مکانیسم های مولکولی درگیر در بیماری آلزایمر، فرضیه ی آبشار آمیلوئید می باشد. بر اساس این فرضیه، فرآیند تخریب نورونی عمدتاً ناشی از سمیت حاصل از تجمع داخل و خارج سلولی پپتیدهای آمیلوئید بتا (A β) و به دنبال آن تجمع اشکال هایپر فسفریله پروتئین تاو در کلاف های نوروفیبریلی در جسم سلولی نورون ها می باشد (۳۱-۲۹). یافتن عوامل تأثیرگذار بر روند پلیمریزاسیون/ دپلیمریزاسیون توبولین ها بسیار مهم است؛ زیرا با عدم پلیمریزاسیون/ دپلیمریزاسیون توبولین ها، ساختمان سلول های نورونی و نیز انتقالات درون و بین سلولی و در نهایت حافظه، از بین می رود. هر گونه نقص در انتقالات درون یا بین سلولی، به نوبه خود منجر به اختلالات مغزی، حافظه و رفتارهای هوشمندانه در موجود زنده می شود (۳۲).

لیپوپلی ساکارید از جمله ترکیباتی است که به صورت غیر مستقیم و از طریق مسیرهای آنزیمی، با هایپر فسفریلاسیون پروتئین تاو، انفصال آن از میکروتوبول و در نهایت ناپایداری سازی شبکه های میکروتوبولی، در القاء بیماری های تحلیل برنده سیستم عصبی به خصوص آلزایمر نقش دارد (۱۳). در این مطالعه ما تأثیر میان کنش LPS با دایمرهای توبولینی را بر ساختار و دینامیک پلیمریزاسیون آن ها، در شرایط *in vitro* مورد بررسی قرار داده ایم.

در این مطالعه، ابتدا دایمرهای توبولینی طی دو سیکل پلیمریزاسیون/ دپلیمریزاسیون و به دنبال آن، عبور از ستون سلولز فسفات تخلیص و خلوص

آن ها با استفاده از SDS-PAGE بررسی و مورد تأیید قرار گرفت. در ادامه تأثیر LPS بر ساختارهای دوم و سوم دایمرهای توبولینی، به ترتیب با استفاده از روش فلورسانس ذاتی و دورنگ نمایی دورانی مورد بررسی قرار گرفت. بر اساس نتایج به دست آمده میزان نشر فلورسانس توبولین در حضور LPS، در روندی وابسته به دوز کاهش می یابد. این یافته بیانگر اثر LPS بر ساختار سوم توبولین و حرکت ریشه های آروماتیک، عمدتاً ترپتوفان، از عمق پروتئین به سطح آن می باشد. بر اساس مطالعات صورت گرفته مارپیچ آلفا ساختار غالب دوم در توبولین های آلفا و بتا بوده و نقشی برجسته در پلیمریزاسیون و در نتیجه عملکرد آن ها بر عهده دارد. از این رو هر عاملی که موجب کاهش محتوای مارپیچ آلفا در توبولین های آلفا و بتا گردد، می تواند منجر به اختلال در عملکرد این پروتئین ها گردد. بر اساس نتایج حاصل از مطالعات اسپکتروپلاریمتری و کدورت سنجی، LPS با کاهش میزان محتوای ساختارهای دوم توبولین های آلفا و بتا تأثیری نامطلوب بر دینامیک پلیمریزاسیون آن ها بر جای گذاشته است. بر اساس نتایج به دست آمده، LPS با کاهش تمایل دایمرهای توبولینی به یکدیگر، علاوه بر کاهش سرعت پلیمریزاسیون آن ها، موجب کاهش طول شبکه های میکروتوبولی نیز شده است.

نتایج حاصل از مطالعه ما برخی از جنبه های ساختاری میان کنش مستقیم LPS با هترو دایمرهای توبولین و اثر آن بر فرآیند شکل گیری پلیمرهای میکروتوبولی را مورد توجه قرار داده است. در همین راستا به نظر می رسد مطالعه میان کنش LPS با هترو دایمرهای توبولینی در حضور پروتئین تاو بتواند ما را در فهم دقیق تر نقش LPS در شکل گیری بیماری های تحلیل برنده سیستم عصبی از جمله آلزایمر یاری نماید.

نتیجه گیری:

نتایج حاصل از این مطالعه به خوبی نشان دادند که بین پلیمریزاسیون توبولین ها و لیوپیلی ساکارید، از طریق تغییر ساختار سوم و دوم توبولین ها و همچنین عدم پلیمریزاسیون آن ها به دستجات منظم یافته میکروتوبولی، ارتباط مستقیم وجود دارد. به این ترتیب می توان لیوپیلی ساکارید را پس از ارزیابی مطالعات بر روی سلول های مغزی کشت شده انسانی و یا مدل های حیوانی، به عنوان یکی از عوامل موثر در ایجاد بیماری های تحلیل برنده سیستم عصبی از جمله آلزایمر مطرح کرد.

تشکر و قدردانی:

بدینوسیله از حمایت های مالی پژوهشکده علوم و فناوری زیستی دانشگاه صنعتی مالک اشتر تهران در انجام رسیدن این مطالعه قدردانی می شود. همچنین از مرکز تحقیقات بیوشیمی بیوفیزیک دانشگاه تهران و نیز خانم الهام السادات مصطفوی، به خاطر راهنمایی و همکاری در انجام این آزمایش سپاسگزاری می شود. این مطالعه مربوط به پایان نامه کارشناسی ارشد دانشگاه صنعتی مالک اشتر تهران می باشد که در تاریخ ۹۲/۵/۲۰ به تصویب رسید.

منابع:

1. Liu Y, Walter S, Stagi M, Cherny D, Letiembre M, Schulz-Schaeffer W, et al. LPS receptor (CD14): A receptor for phagocytosis of Alzheimer's amyloid peptide. *Brain*. 2005; 128(Pt 8): 1778-89.
2. Kim WG, Mohny RP, Wilson B, Jeohn GH, Liu B, Hong JS. Regional difference in susceptibility to lipopolysaccharide-induced neurotoxicity in the rat brain: Role of microglia. *J Neurosci*. 2000; 20(16): 6309-16.
3. Banks WA, Robinson SM. Minimal penetration of lipopolysaccharide across the murine blood-brain barrier. *Brain Behav Immun*. 2010; 24(1): 102-9.
4. Guzik BW, Goldstein LS. Microtubule-dependent transport in neurons: Steps towards an understanding of regulation, function and dysfunction. *Curr Opin Cell Biol*. 2004; 16(4): 443-50.
5. Black MM, Lasek RJ. Slow components of axonal transport: two cytoskeletal networks. *J Cell Biol*. 1980; 86(2): 616-23.
6. Goldstein LS, Yang Z. Microtubule-based transport systems in neurons: The roles of kinesins and dyneins. *Annu Rev Neurosci*. 2000; 23: 39-71.
7. Faber J, Portugal R, Rosa LP. Information processing in brain microtubules. *Biosystems*. 2006; 83(1): 1-9.
8. Hameroff SR, Watt RC. Information processing in microtubules. *J Theor Biol*. 1982; 98(4): 549-61.
9. Minoura I, Muto E. Dielectric measurement of individual microtubules using the electroorientation method. *Biophys J*. 2006; 90(10): 3739-48.
10. Nogales E. Structural insights into microtubule function. *Annu Rev Biophys*. 2001; 30(1): 397-420.
11. Ballatore C, Brunden KR, Hurn DM, Trojanowski JQ, Lee VM, Smith AB, 3rd. Microtubule stabilizing agents as potential treatment for Alzheimer's disease and related neurodegenerative tauopathies. *J Med Chem*. 2012; 55(21): 8979-96.
12. Cash AD, Aliev G, Siedlak SL, Nunomura A, Fujioka H, Zhu X, et al. Microtubule reduction in Alzheimer's disease and aging is independent of tau filament formation. *Am J Pathol*. 2003; 162(5): 1623-7.
13. Iqbal K, Grundke-Iqbal I, Zaidi T, Merz PA, Wen GY, Shaikh SS, et al. Defective brain microtubule assembly in Alzheimer's disease. *Lancet*. 1986; 2(8504): 421-6.
14. Shevtsov PN, Shevtsova EF, Burbaeva G, Bachurin SO. Disturbed assembly of human cerebral microtubules in Alzheimer's disease. *Bull Exp Biol Med*. 2006; 141(2): 265-8.
15. Almos PZ, Horvath S, Czibula A, Rasko I, Sipos B, Bihari P, et al. H1 tau haplotype-related genomic variation at 17q21.3 as an Asian heritage of the European Gypsy population. *Heredity*. 2008; 101(5): 416-9.

16. Cleveland DW, Hwo SY, Kirschner MW. Purification of tau, a microtubule-associated protein that induces assembly of microtubules from purified tubulin. *J Mol Biol.* 1977; 116(2): 207-25.
17. Goedert M, Baur CP, Ahringer J, Jakes R, Hasegawa M, Spillantini MG, et al. PTL-1, a microtubule-associated protein with tau-like repeats from the nematode *Caenorhabditis elegans*. *J Cell Sci.* 1996; 109 (Pt 11): 2661-72.
18. Gong CX, Liu F, Grundke-Iqbal I, Iqbal K. Post-translational modifications of tau protein in Alzheimer's disease. *J Neural Transm.* 2005; 112(6): 813-38.
19. Braak H, Braak E. Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol.* 1991; 82(4): 239-59.
20. Li Y, Liu L, Barger SW, Griffin WS. Interleukin-1 mediates pathological effects of microglia on tau phosphorylation and on synaptophysin synthesis in cortical neurons through a p38-MAPK pathway. *J Neurosci.* 2003; 23(5): 1605-11.
21. Lustig S, Danenberg HD, Kafri Y, Kobiler D, Ben-Nathan D. Viral neuroinvasion and encephalitis induced by lipopolysaccharide and its mediators. *J Exp Med.* 1992; 176(3): 707-12.
22. Chow JC, Young DW, Golenbock DT, Christ WJ, Gusovsky F. Toll-like receptor-4 mediates lipopolysaccharide-induced signal transduction. *J Biol Chem.* 1999; 274(16): 10689-92.
23. Wright SD, Ramos RA, Tobias PS, Ulevitch RJ, Mathison JC. CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science.* 1990; 249(4975): 1431-3.
24. Kitazawa M, Oddo S, Yamasaki TR, Green KN, LaFerla FM. Lipopolysaccharide-induced inflammation exacerbates tau pathology by a cyclin-dependent kinase 5-mediated pathway in a transgenic model of Alzheimer's disease. *J Neurosci.* 2005; 25(39): 8843-53.
25. Wang T, Qin L, Liu B, Liu Y, Wilson B, Eling TE, et al. Role of reactive oxygen species in LPS-induced production of prostaglandin E2 in microglia. *J Neurochem.* 2004; 88(4): 939-47.
26. Bilbo SD, Biedenkapp JC, Der-Avakian A, Watkins LR, Rudy JW, Maier SF. Neonatal infection-induced memory impairment after lipopolysaccharide in adulthood is prevented via caspase-1 inhibition. *J Neurosci.* 2005; 25(35): 8000-9.
27. Thomson LM, Sutherland RJ. Systemic administration of lipopolysaccharide and interleukin-1beta have different effects on memory consolidation. *Brain Res Bull.* 2005; 67(1-2): 24-9.
28. Miller HP, Wilson L. Preparation of microtubule protein and purified tubulin from bovine brain by cycles of assembly and disassembly and phosphocellulose chromatography. *Methods Cell Biol.* 2010; 95: 3-15.
29. Checler F, Vincent B. Alzheimer's and prion diseases: Distinct pathologies, common proteolytic denominators. *Trends Neurosci.* 2002; 25(12): 616-20.
30. Robinson SR, Bishop GM. Abeta as a bioflocculant: Implications for the amyloid hypothesis of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.* 2002; 23(6): 1051-72.
31. Mandelkow E-M, Mandelkow E. Tau in Alzheimer's disease. *Trends Cell Biol.* 1998; 8(11): 425-7.
32. Puig B, Ferrer I, Luduena RF, Avila J. BetaII-tubulin and phospho-tau aggregates in Alzheimer's disease and Pick's disease. *J Alzheimers Dis.* 2005; 7(3): 213-20.

Study of the effect of bacterial lipopolysaccharide on the structure and dynamics on mouse tubulin polymerization

Hashemi Shahraki F¹, Nasiri Khalili MA^{2*}, Kodadadi S², Riazi GhH³

¹Student, Biochemistry and Biophysics Dept., Tehran Malek ashtar University of Technology, Tehran, I.R. Iran; ²Biochemistry and Biophysics Dept., Tehran Malek ashtar University of Technology, Tehran, I.R. Iran; ³Biochemistry and Biophysics Research Center, Tehran University, Tehran, I.R. Iran.

Received: 27/Feb/2016 Accepted: 3/May/2016

Background and aims: In recent decades, there has been much research on the microtubule dynamics as well as on factors affecting it. According to different studies, lipopolysaccharide (LPS) is thought to play an indirect role in neurodegenerative diseases through enzymatic pathways which hyperphosphorylate Tau protein and dissociate it from microtubules. In the present study, it was aimed to assess the direct effect of LPS on the structure and dynamics of tubulin polymerization *in vitro*.

Methods: In this study, mouse tubulins were purified through two cycles of temperature-dependent polymerization-depolymerization. Cellulose-phosphate chromatography was used to further purify tubulins. SDS-PAGE was used to analyze the purity of the tubulins. Circular dichroism (CD), intrinsic fluorescence and turbidity assays were used to assess the changes in secondary and tertiary structures, and the dynamics of tubulin polymerization in the presence of different concentrations of LPS (5pM, 5nM, 50nM, 0.5μM and 5μM), respectively.

Results: SDS-PAGE analysis confirmed the purity of tubulins. The intrinsic fluorescence analysis and CD assay revealed the changes in the secondary and tertiary structures of tubulins in the presence of LPS. The results of turbidity assay indicated that LPS could reduce the polymerization of tubulins.

Conclusion: Our results indicate that LPS is able to change the secondary and tertiary structures of tubulin and decreases tubulin polymerization. According to our results, lipopolysaccharide in addition to an indirect effect on the microtubules stability, as well as by decreases in tubulin polymerization could result in neurodegenerative diseases specially Alzheimer's diseases.

Keywords: Rat tubulins, Lipopolysaccharide, Polymerization, Microtubule, Alzheimer's diseases.

Cite this article as: Hashemi Shahraki F, Nasiri Khalili MA, Kodadadi S, Riazi GhH. Study of the effect of bacterial lipopolysaccharide on the structure and dynamics on mouse tubulin polymerization. J Shahrekord Univ Med Sci. 2017; 18(6): 44-52.

*Corresponding author:

Biochemistry and Biophysics Dept., Tehran Malek ashtar University of Technology, Tehran, I.R. Iran. Tel: 00982122970085, E-mail: manasiri@alumni.ut.ac.ir